**М.И. Вудмаска, В.Г. Найденов, А.В. Ногарев, Л.П. Бучацкий**
*(АОЗТ «ДиаПроф Мед», НТЦ Центр иммунобиотехнологии, НТК Институт монокристаллов; Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко; Институт рыбного хозяйства УААН)*

# РАЗРАБОТКА ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РЕТРОВИРУСА ЛИМФОСАРКОМАТОЗА ЩУК

Лимфосаркоматоз щук – неопластическое заболевание, вызывающее значительную гибель половозрелых рыб. Впервые это заболевание было описано в Ирландии у щук Esox lucius в 1963 г. В континентальной Европе лимфосаркоматоз впервые был описан у щук, отловленных в Киевском водохранилище в 2000 г. Дальнейшие исследования показали, что это заболевание щук широко распространено также в Каневском, Кременчугском и Каховском водохранилищах днепровского каскада.

Ретровирус, ассоциированный с лимфосаркоматозом щук, способен в экспериментах передаваться молодым особям и до сих пор является малоизученным представителем недавно образованного рода вирусов Epsilonretrovirus.

В настоящей статье нами представлены результаты работы по подбору праймеров и постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) с целью диагностики и изучения биологических свойств этого ретровируса.

### Материалы и методы

**Очистка геномной ДНК.** Суммарная геномная ДНК щуки (с видимыми симптомами ретровирусного поражения, а также здоровой) была очищена с использованием набора «Genomic DNA Purification Kit» фирмы Qiagen по методике, предложенной производителем.

**Праймеры для ПЦР.** В первом варианте опытов подбор праймеров осуществлялся на основе анализа нуклеотидных последовательностей, кодирующих циклины ретровирусов рыб, а именно вируса эпидермальной гиперплазии судака 1-го и 2-го типов. Выбранные праймеры имели такие последовательности:

**WEHV1f1 5′- ATGGARAARTAYCTNAAYC-3′**
**WEHV1f2 5′- ACTGCATATGGARAARTAYCTNAAYCCNCARGC-3′**
**WEHV1r 5′- CTACTCGAGRTCNGCRCANARATCNARDATYTT-3′**

Во второй серии опытов последовательности праймеров для ПЦР были составлены на основании анализа консервативных участков гена РНК-зависимой ДНК-полимеразы различных ретровирусов (включая, кроме вышеупомянутых, ВИЧ-1, ВИЧ-2, ретровирус змееголова, вирус лейкоза КРС, вирус саркомы Рауса, вирус дермальной саркомы судака). Первая пара праймеров фланкировала относительно консервативный участок pol-гена длиной около 120 нуклеотидов, вторая пара соответствовала участкам последовательности в пределах вышеуказанного 120-нуклеотидного фрагмента и предназначалась для второго раунда ПЦР с использованием в качестве матрицы продукта первого раунда.

**ПЦР геномной ДНК щуки.** В первом раунде ПЦР в качестве матрицы использовали 1 мкг суммарной ДНК, выделенной из пораженных участков кожи и мышц больной щуки, а также из аналогичных образцов тканей щуки, не имевшей видимых поражений (предполагаемо здоровой).

Реакционная смесь для ПЦР содержала в объеме 50 мкл:

20 мМ трис HCl, pH 8.5;
10 мМ $(NH_4)_2\ SO_4$;
2 mM $MgCl_2$;
100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина;
0,1% тритон X-100;
0,2 мМ каждого из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов;
1 мкг ДНК-матрицы;
1 мкМ каждого из праймеров F1 и R1;
2,5 единицы активности Taq полимеразы (Fermentas)
Условия ПЦР: денатурация: 94° C, 1 мин
отжиг праймеров: 50° C, 1 мин
синтез: 72° C, 1 мин

После проведения 30 циклов ПЦР 15 мкл реакционной смеси анализировали электрофорезом в 2% агарозном геле, а 1 мкл реакционной смеси использовали в качестве матрицы во втором раунде ПЦР с праймерами F2 и R2.

**Клонирование ПЦР-продукта.** Продукт второго раунда ПЦР (фрагмент размером около 100 пар нуклеотидов) был вырезан из агарозного геля и клонирован в плазмиду pUC19 по сайту рестрикции HincII

### Результаты и обсуждение

Многолетними наблюдениями установлено, что лимфосаркоматоз щук

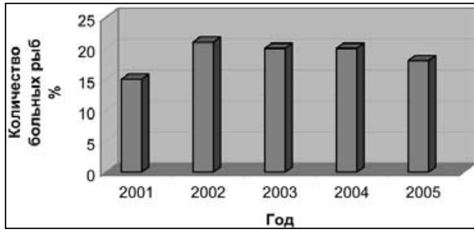



**Рис. 1. Уровни заболеваемости щук Esox lucius лимфосаркоматозом в Каневском водохранилище**

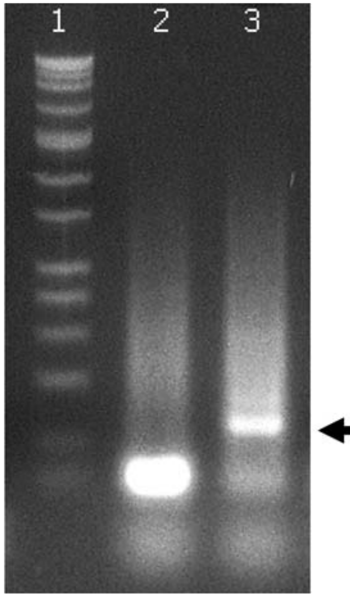



**Рис. 2. Электрофореграмма разделения в 2%-ном агарозном геле продуктов второго раунда ПЦР.**
**1 – ДНК маркеры. Положение маркера размером 100 нуклеотидных пар показано стрелкой.**
**2 – продукты ПЦР, полученные на ДНК-матрице из здоровой щуки;**
**3 – продукты ПЦР, полученные на ДНК-матрице из больной щуки.**

встречается в водохранилищах ежегодно (рис. 1). Тело больных половозрелых щук покрыто язвами диаметром 4-11 см, заболевание носит сезонный характер и проявляется весной или осенью. Для выявления ретровируса у внешне здоровых щук мы разработали метод цепной полимеразной реакции (ПЦР).

Проведенные исследования показали, что праймеры, синтезированные на основе последовательностей, кодирующих циклины ретровирусов рыб, оказались малоэффективными для диагностики ретровируса щуки из днепровских водохранилищ. Получить дискретные продукты ожидаемой длины не удалось.

Для подбора более эффективных праймеров был осуществлен сравнительный анализ последовательностей нуклеотидов в области, кодирующей РНК-зависимую ДНК-полимеразу ряда ретровирусов, (HIV-1, HIV-2, HTLV-1, ретровирус змееголова, вирус лейкоза КРС, вирус саркомы Рауса, вирус дермальной саркомы судака, вирус эпидермальной гиперплазии судака 1-го и 2-го типов).

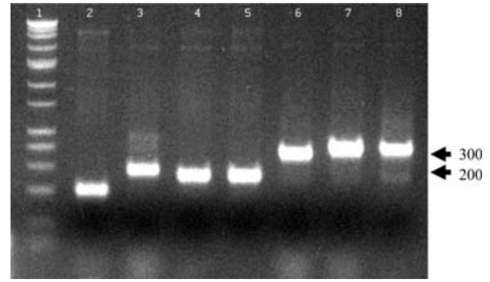



**Рис. 3. ПЦР - анализ рекомбинантных плазмид.**
**1. – ДНК-маркеры. Стрелками показано положение в геле фрагментов размером 200 и 300 нуклеотидных пар;**
**2. – продукт ПЦР при использовании в качестве матрицы контрольной плазмиды.**
**3-8. — продукты ПЦР при использовании в качестве матрицы рекомбинантных плазмид (клоны №№1, 2, 3, 4, 5, и 6, соответственно).**

При этом эффективность и специфичность ПЦР была увеличена за счет применения двухэтапной реакции: сначала использовались праймеры F1 и R1, а затем продукт реакции использовался в качестве матрицы на втором этапе ПЦР с праймерами F2 и R2.

Результаты экспериментов с использованием праймеров, составленных на основании анализа гомологичных участков генов РНК-зависимой ДНК-полимеразы различных ретровирусов рыб показали, что они могут быть использованы для диагностики вируса лимфосаркоматоза щук.

Можно видеть (рис. 2), что в в результате двухраундовой ПЦР мы наблюдаем амплификацию фрагмента ДНК с ожидаемым размером около 100 нуклеотидных пар, причем этот фрагмент образуется только на ДНК-матрице, полученной из тканей больной щуки (дорожка 3), в то время как на ДНК здоровой щуки (дорожка 2) соответствующий фрагмент отсутствует.

С целью проведения анализа нуклеотидной последовательности вышеуказанного фрагмента последний был клонирован в плазмиду pUC-19. Анализ рекомбинантных клонов проводили методом ПЦР на уровне колоний с использованием универсальных для плазмид серии pUCпраймеров m13 forward и m13 reverse. (рис. 3). В качестве контроля использова-

ли нерекомбинантную плазмиду.

На рисунке 3 видно, что контрольная плазмида (дорожка 2) дает в ПЦР фрагмент размером 200 пар оснований, что соответствует расстоянию между участками отжига универсальных праймеров в «пустой» плазмиде, тогда как рекомбинантные плазмиды (дорожки 3,4,5) содержат дополнительную вставку размером около 100 пар оснований или 200 пар оснований (доржки 6,7,8). Мы предполагаем, что в последнем случае имело место «тандемное» встраивание ПЦР-продукта в плазмиду.

Было проведено гель-секвенирование указанных рекомбинантных плазмид в области вставок и сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями генов РНК-зависимой ДНК-полимеразы различных ретровирусов рыб.

Установлено, что последовательность вставки плазмиды клона № 2 имеет слабо выраженную гомологию с pol-генами вируса дермальной саркомы судака, вирусов эпидермальной гиперплазии судака 1-го и 2-го типов, последовательности которых представлены в базе данных GenBank, и в то же время практически идентична нуклеотидной последовательности ТМ4 неохарактеризованного пока ирландского изолята ретровируса щуки (Dongy, личное сообщение).

Таким образом, представленные данные указывают на то, что щуки днепровских водохранилищ, пораженные лимфосаркоматозом, по-видимому, заражены ретровирусом, филогенетически близким ретровирусу, ранее обнаруженному у щук в водоемах Ирландии.

Более точная систематизация обнаруженного ретровируса щук на основе определения полной нуклеотидной последовательности его генов является предметом дальнейших исследований.

Литература

1. Mulcahy M.F. Lymphosarcoma in the pike Esox lucius L. (Pisces:Esocidae) in Ireland. Proceedings of the Royal Irish Academy, Section B: Biological, Geological and Chemical Science.-1963, 63, 103-129.
2. Бучацкий Л.П. Лимфосаркома щук Киевського водохранилища. Ветеринарная медицина Украины. 2000, №11,с.14-15.
3. Бучацкий Л.П., Вовк Н.И., Яременко Д.М. Эпизоотическая неоплазия щук Киевского и Каневского водохранилищ. Тез.докл. V111 съезда гидробиол. об-ва РАН. Калининград, 2001, т.2, с.3-4. Бучацкий Л.П., Вовк Н.І. Галахин К.О. Гистологическая структура опухолей при лимфосаркоматозе щуки и карциноме леща. Рибное хозяйсттво, 2003, вип.62, с.121-12 4.
5. Бучацкий Л.П., Бузевич И.Ю., Галахин К.А., Ногарев А. В. Эпизоотологический мониторинг лимфосаркоматоза судака (Stizostedion lucioperca) в Каховском и Каневском водохранилищах. Вет. Медицина Украины.- 2006, №2 с.7-8.
6. Mulcahy M.F, O-Leary A. Cell-free transmission of lymphosarcoma in the northern pike Esox lucius L. (Pisces:Esocidae). Experientia (Basel), 1979, 26, p.891.

**А.А. Савельев**
*(НГСХА)*

# ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПОСЛЕ ДЕГЕЛЬМИНТИЗАЦИИ

Экспериментально и научно-производственными опытами установлена эффективность дегельминтизации альбеном на фоне комплексного использования иммуномодулятора-рибонуклеота натрия. Иммуномодуляторы нормализуют отрицательное действие гельминтов и антгельминтиков на организм, способствуют восстановлению иммунного статуса, лучшему перевариванию и усвоению питательных веществ кормов. Основываясь на этой закономерности и учитывая зональные особенности Нижегородской области, мы проводили научно-производственные опыты на бычках, спонтанно заражённых трематодами. Животные находились на стойловом содержании. Недостаток макро- и микроэлементов сбалансировали включением смеси солей микроэлементов.

Всего под опытом находилось 15 бычков, спонтанно зараженных фасциолами и парамфистомами. Животных разделили на группы: первая служила зараженным контролем, вторую дегельминтизировали альбеном в дозе 20 г/400 кг массы тела, третью – альбеном плюс в той же дозе, четвертой